第2卷第4期增刊　　动 物 学 研 究　　Vol.2, No.4
1981年11月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　Nov., 1981

浙江蝮蛇毒碱性磷酯酶A的分离纯化及其性质的研究

武祥福　陈远聪
（中国科学院上海生物化学研究所）

摘　要

采用DEAE-纤维素柱层析将浙江蝮蛇毒分离后，测得二个磷酯酶A活性峰。其中之一是在用平衡缓冲液最先洗脱下来的，为碱性磷酯酶A。另一是在含0.1*M* NaCl的缓冲液洗脱下来的，包含有一个酸性磷酯酶A和一个我们在前文已报道的突触前神经毒素。

本文报道的是碱性磷酯酶A的纯化及其性质的研究。碱性磷酯酶A进一步经磷酸-纤维素，CM-Sephadex C-50和Sephadex G-75柱层析纯化，得到一个在聚丙烯酰胺凝胶电泳上为一条区带的单一蛋白。其分子量为13,800左右，由121个氨基酸残基组成，富含半胱氨酸（14个），酪氨酸，甘氨酸和脯氨酸，等电点为9.3。

如同其他蛇毒磷酯酶A的性质相似，此碱性磷酯酶A显示很好的热稳定性。胰蛋白酶不能使它的酶活性完全丧失。

在动物毒素中普遍含有磷酯酶A（以下简称PhA），蛇毒则是PhA最丰富的来源之一。昆明动物研究所四室[1]、上海生化研究所[2]分别对于我国常见的几种蛇毒PhA的酶活性的测定证明了PhA在各科蛇毒中的存在。其中以眼镜蛇毒、金环蛇毒的活力较高，而烙铁头蛇毒、竹叶青蛇毒的活力较低。

蛇毒PhA是属于A_2型，显示在催化磷酯脂肪酸的酯链水解时，具位置和立体的专一性。PhA的毒性在于能使血液中卵磷酯水解释放出一分子脂肪酸而成为溶血卵磷酯，从而使红细胞溶解，析出血红蛋白，产生溶血效应。故PhA也被传统地称为“间接溶血素”。近年来对蛇毒PhA的深入研究表明对心血管系统及神经系统都有直接毒性作用，能引起动物肺出血，心室纤维性颤动，直至强直收缩，而且能导致呼吸抑制、直至昏迷死亡。

1968年以来，从各种蛇毒中分离纯化PhA的制剂(包括一些结晶)已有四、五十种之多[3,4] 其中已完成氨基酸顺序测定的也有近二十种。氨基酸顺序表明各种蛇毒中的PhA

具有很多相似之处，共同的特征是有较高的二硫键含量，从而具极好的热稳定性，成为蛇毒中特异的酶。PhA的分子量在海蛇科蛇毒中一般为11,000左右；在眼镜蛇等其他科属的蛇毒中在12,000～15,000之间，其中有些PhA是以其分子量为30,000的二聚体存在。

本文报道浙江蝮蛇毒碱性PhA的分离纯化及其一些性质的研究。采用DEAE-纤维素柱层析将浙江蝮蛇毒进行分离后，测得二个PhA活性峰。其中之一是在含0.1*M* NaCl的缓冲液洗脱下来的，在这一活性峰中又包含着一个酸性PhA和一个我们在前文中已经报道的突触前神经毒素[5]。另一个在用平衡缓冲液最先洗脱下来的PhA活性峰，再经磷酸-纤维素，CM-Sephadex C-50及Sephadex G-75柱层析纯化，得到一个在聚丙烯酰胺凝胶电泳上为单一区带的、分子量为13,800左右，等电点为9.3的单链碱性PhA。

材　　料

蝮蛇毒为上海花木公司实验动物材料供应站供给（1980年采集冷冻干燥成粉状，存于冰箱）。DEAE-纤维素（DE-22）、CM-Sephadex C-50、磷酸-纤维素、Sephadex G-75均为Pharmacia产品，甲叉双丙烯酰胺为Aldrich产品，四甲基乙二胺为BDH产品，肌红蛋白为Sigma产品，卵白蛋白、胰蛋白酶、糜蛋白酶、枯草杆菌酶、核糖核酸酶及Ampholine（pH 4～10），均为生化研究所东风生化试剂厂产品，其它试剂均为国产分析纯。

实验方法与结果

一、碱性PhA的分离纯化

1．DEAE-纤维素柱层析（图1）

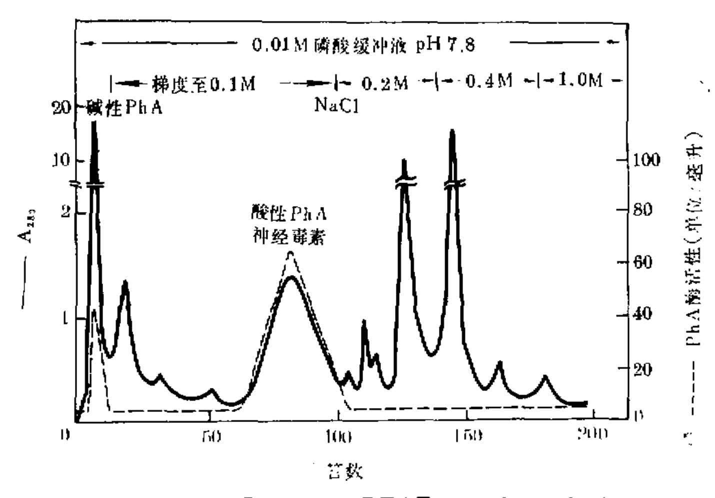


图1　蝮蛇毒PhA组分的DEAE-纤维素柱层析图谱

称取浙江蝮蛇毒冷冻干粉20克，溶于100毫升含0.01*M* EDTA的0.01*M*磷酸缓冲液中，离心去除沉淀物，上清液用NaOH调到pH8.0，上DEAE-纤维素柱（柱体积为5.5×50厘米，用0.01*M*磷酸缓冲液pH7.8平衡），用体积各为6000毫升的平衡缓冲液及含0.1*M* NaCl的缓冲液作直线梯度洗脱，然后再分别用0.2*M*；0.4*M*、1.0*M* NaCl作分级洗脱。洗脱液用部分收集器收集，每瓶100毫升，每小时收集200毫升。碱性PhA组分收集在第6～8瓶，合并收集液经超滤浓缩后进行第二步分离。

2. 磷酸-纤维素柱层析（图2）

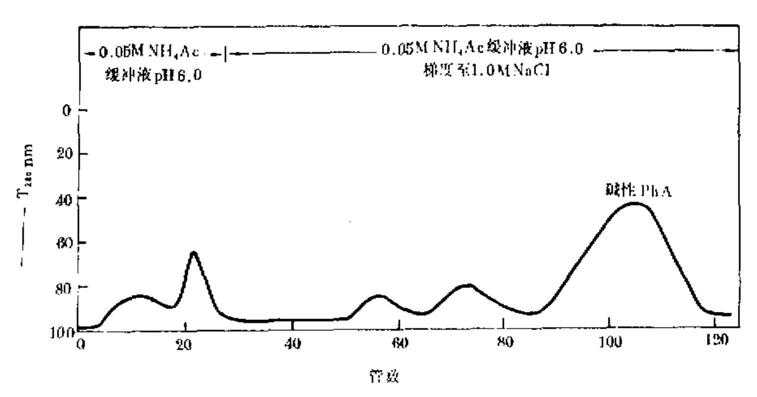


图2　磷酸-纤维素柱层析图谱

从DEAE-纤维素柱层析收集的含碱性PhA部分（约1克）调节其pH和离子强度与柱平衡缓冲液（0.05*M* NH_4Ac、pH6.0）相同后上磷酸-纤维素柱（3×20厘米），先用平衡缓冲液(240毫升)作第一步洗脱，然后再用体积各为500毫升的平衡缓冲液及含1.0*M* NaCl的缓冲液作直线梯度洗脱。用部分收集器收集，每管10毫升，每小时收集60毫升。碱性PhA收集在第88～96管。

3. CM-Sephadex C-50柱层析（图3）

将磷酸-纤维素柱层析收集的碱性PhA部分(约500毫克）调节其pH和离子强度与柱平衡缓冲液（0.05*M* NaAc，pH6.0）相同后上CM-Sephadex C-50柱（3×20厘米），用体积各为500毫升的平衡缓冲液及含0.4*M* NaCl的缓冲液作直线梯度洗脱。用部分收集器收

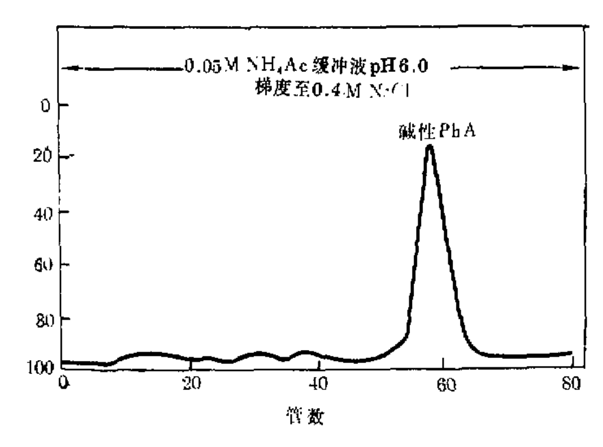


图3　CM-Sephadex C-50柱层析图谱

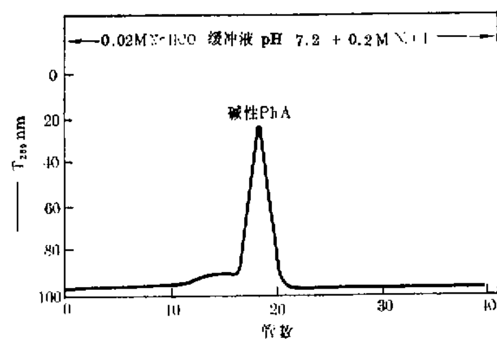


图4 Sephadex G-75柱层析图谱

集，每管10毫升，每小时收集60毫升。碱性PhA组分收集在第54～62管，合并收集液用旋转蒸发浓缩，再经Sephadex G-15脱盐，冷冻干燥成干粉。

4. *Sephadex G*-75柱层析（图4）

从CM-Sephadex C-50柱层析得到的碱性PhA干粉（约20毫克），用柱平衡缓冲液0.02*M* $NaHCO_3$加0.2*M* NaCl，pH7.2溶解后上SephadexG-75柱（1×100厘米）。用部分收集器收集，每管4毫升，每小时收集24毫升。碱性PhA组分收集在第17～20管，经旋转蒸发浓缩后，用Sephadex G-15脱盐，冷冻干燥，即得到纯化的碱性PhA（每次约15毫克），贮存于冰箱备用。

二、纯度鉴定

1. *pH*2.9聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳[6]

分离胶：交联度C＝2.6%，凝胶浓度T＝10%，以pH2.9 KOH-HAc缓冲液配胶。浓缩胶：C＝2.6%，T＝3%，以pH6.7 KOH-HAc缓冲液配胶。电极缓冲液为0.37*M*甘氨酸-柠檬酸缓冲液pH3.2。上槽接正极，下槽接负极。

样品100微克溶于含10%蔗糖的电极缓冲液20微升中，加入一小滴0.01%甲烯蓝作指示剂。控制电流每管2毫安，电压100V，电泳时间为6小时，以冰水浴保持电极缓冲液温度低于10°C。电泳完毕取出凝胶，先用10%三氯醋酸固定10分钟，然后经水洗几遍，用含0.25%考马斯亮蓝R-250的染色液（乙醇：冰醋酸：水＝4：1：5 V/V）染色1小时，用脱色液（乙醇：冰醋酸：水＝4：1：5 V/V）脱色。

2. *pH*8.9 *SDS*-聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳[6]

分离胶：C＝2.6%，T＝13%，以pH8.9 Tris-HCl缓冲液加0.1%SDS配胶。浓缩胶：C＝2.6%，T＝3%，以pH6.7 Tris-HCl缓冲液加0.1%SDS配胶。电极缓冲液为pH8.3的0.37*M*甘氨酸-Tris缓冲液稀释5倍后加0.1%SDS。上槽接负极，下槽接正极。

样品50微克，用含1%SDS加0.1%巯基乙醇电极缓冲液在37°C保温3小时，电泳前加入一小滴0.1%溴酚蓝液作指示剂。控制电流每管2毫安，电压50V，电泳时间为4.5小时（室温）。蛋白的固定、染色、脱色与以上pH2.9电泳条件相同。

3. 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦圆盘电泳[6]

凝胶C＝2.6%，T＝5%，加入2%Ampholine（pH4～10）。电极溶液：上槽为0.4%乙醇胺，接负极；下槽为0.2%硫酸，接正极。

样品100微克，溶于含有2%Ampholine（pH4～10）及10%蔗糖溶液中，以溴酚蓝作指示剂。控制电流每管1毫安，电压50V。电泳在冰水浴中过夜（约16小时）。电

泳完毕后取出凝胶直接在含5%HAc的四色染色液[13]（亮绿：溴酚蓝：考马斯亮蓝：罗丹明B=10:20:1:1W/W）中染色10分钟，于脱色液（同上）中脱色。

用以上三种不同类型的聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳鉴定结果(图5)，均为一条区带，因此认为此碱性PhA为电泳纯蛋白。

三、分子量测定

1. *Sephadex* G-75凝胶过滤

Sephadex G-75柱（1×100厘米）用0.02*M* $NaHCO_3$，pH7.2缓冲液加0.2*M* NaCl平衡，流速每小时为24毫升，以280nm蛋白监测仪测定蛋白吸收峰。

碱性PhA及标准样品（卵白蛋白，枯草杆菌酶、糜蛋白酶、肌红蛋白、核糖核酸酶）各2毫克，分别溶于0.5毫升平衡缓冲液中上柱。以蛋白分子量的对数对凝胶过滤柱洗脱体积作图（图6），求得碱性PhA的分子量为13,700。

2. *pH*8.9 *SDS*-聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳

碱性PhA及标准样品（卵白蛋白，胰蛋白酶、肌红蛋白、核糖核酸酶、糜蛋白酶）各50微克，样品处理及电泳条件同纯度鉴定方法2。电泳完毕经染色，测得各样品电泳的迁移率对蛋白分子量的对数作图(图6)，求得碱性PhA的分子量为14,000。

●----● pH 8.9 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
●——● Sephadex G-75 凝胶过滤

图6　碱性PhA的分子量测定

四、等电点的测定

样品0.5毫克经聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳后（条件同纯度鉴定方法3），用微型接触电极测得碱性PhA的等电点为9.3。

五、氨基酸组成分析

称取纯化的碱性PhA0.5毫克，于0.5毫升5.7*N*重蒸HCl中，加入20微升的巯基乙酸[14]，然后真空封闭后在110°C水解24小时。

另取一份样品0.5毫克，先用过甲酸氧化，[7]然后迅速真空抽干去除过量的过甲酸，再用0.5毫升5.7*N*重蒸HCl进行全酸水解。水解完毕，分别用氨基酸自动分析仪（Hitachi 835型）定量测定。

氨基酸组成分析表明（表1）这一纯化的碱性PhA是由121个氨基酸残基所组成。由此而计算的分子量为13,800，分子中含7对二硫键。

六、PhA酶活性测定[8]

以卵磷脂为底物，用0.02*N* KOH溶液滴定酶解释放出的脂肪酸，记录不同时间消

耗的KOH溶液的体积，换算成PhA的比活（脂肪酸微克分子/分·毫克酶），测得纯化的碱性PhA的酶活性比活为17.76，为粗毒酶活性的3倍。（图7）

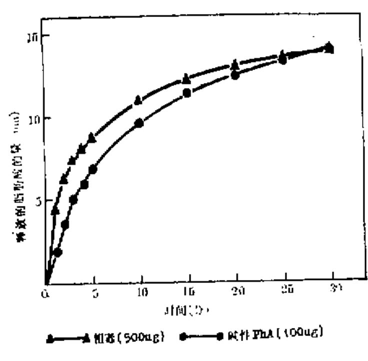


图7 碱性PhA的酶活性测定

七、PhA酶的稳定性试验

1. *温度对碱性PhA酶活性的影响*

纯化的碱性PhA用0.05*M* Tris-HCl缓冲液，pH6.7溶解，于100°C水浴中保温不同时间后迅速冷却，准确吸取等量样品溶液进行酶活性测定，计算酶活性保留的百分数。结果表明100°C保温15分钟后，碱性PhA的酶活性仍然保留85%。（图8）

2. *胰蛋白酶对碱性PhA酶活性的影响*

在pH7.8，0.02*M*磷酸缓冲液中，以胰蛋白酶：碱性PhA＝1：50（W/W）比例混合，于37°C保温30分钟，立即测定PhA酶活性，测得其酶活性为原来的40%左右。（图9）

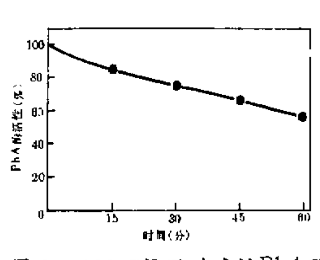


图8 100°C保温对碱性PhA酶活性的影响

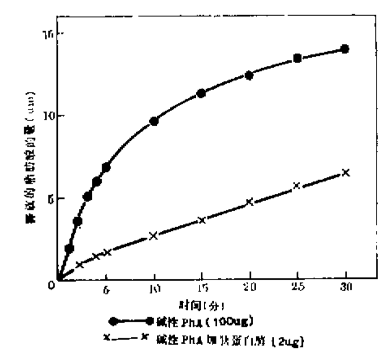


图9 胰蛋白酶对碱性PhA酶活性的影响

讨 论

蛇毒PhA是研究得最为深入和广泛的蛇毒酶类之一，对于其理化性质已有深入了解，特别是一些蛇毒PhA结构的阐明，从而证明蛇毒PhA具有极好的热稳定性是与其分子中有含量较高的二硫键（7～8对）这一结构特征密切相关。除此之外，蛇毒PhA分子中（包括蝮蛇毒碱性PhA）酪氨酸、甘氨酸和脯氨酸的含量都相对地较高，可能与蛇毒PhA所具有的药理和病理效应相关。

如同其他蛇毒PhA一样，蝮蛇毒碱性PhA为Ca^{++}激活，具有极好的热稳定性。我们的实验表明，碱性PhA的热稳定性与它所在溶液的pH有关。在pH6.7溶液中它的热稳定性良好，但在pH7.8的溶液中，100°C加热几分钟，此碱性PhA就完全变性而析出，酶活性也随之而丧失。从而认为蝮蛇毒碱性PhA在酸性条件下稳定性较碱性条件下良好。

国外早期的研究表明一些蛇毒PhA显示了对抗胰蛋白酶水解的特性[9,10]。而我们的实验表明蝮蛇毒碱性PhA并非完全对抗胰蛋白酶的水解，胰蛋白酶也不能使它的酶活性完全丧失。这可能是因为PhA结构中较多的二硫键及氢键等形成了紧密的空间结构，从而增强了PhA的稳定性。关于胰蛋白酶对蝮蛇毒碱性PhA酶活性的影响有待于进一步研究。

许多蛇毒中存在多个PhA的同工酶[11,12]，如眼镜蛇毒、蝰蛇毒中分别有7个同工酶。现在，我们发现在浙江蝮蛇毒中存在三个PhA的同工酶，并且已经纯化了其中的二个，即碱性PhA和突触前神经毒素（也可称为中性PhA具突触前神经毒性）。这二个纯化的同工酶的分子量和氨基酸残基数相近，氨基酸组成也比较相似，但在谷氨酸和赖氨酸残基数上有较大差异，这些差异可能导致各自的等电点的不同。

将浙江蝮蛇毒中已经纯化的二个PhA同工酶与属于不同亚种的日本蝮蛇毒中的二个PhA同工酶相比较。已发表的日本蝮蛇毒中分离得到的二个PhA[8]，其中之一是碱性PhA（Phospholipase A-I），另一是酸性PhA（Phospholipase A-II）。但此二种PhA都不具有突触前神经毒素的功能。比较这两亚种蝮蛇毒中已报道的4个PhA，它们的氨基酸组成及分子量都有很大的相似性，而其中二个碱性PhA更为相近（见表1）。

表1　碱性PhA氨基酸组成及与蝮蛇日本亚种的比较

氨基酸	蝮蛇短尾亚种（浙江） Agkistrodon halys brevicaudus		蝮蛇日本亚种 Agkistrodon halys blomhoffii	
	碱性磷酯酶A	突触前神经毒素	磷酯酶A-I	磷酯酶A-II
Lys	18	9	17	8
His	2	1	2	1
Arg	6	6	6	4
Asp	14	16	14	17
Thr	4	7	6	5
Ser	5	5	5	5
Glu	6	13	6	12
Pro	5	3	5	5
Gly	11	12	10	13
Ala	6	5	5	7
Val	5	3	4	4
Met	3	2	3	2
Ile	4	5	7	7
Leu	4	5	5	3
Tyr	9	9	10	9
Phe	4	6	5	5
1/2-Cys	14	14	14	16
Try	1	0	2	2
残基总数	121	121	126	126
分子量	13,800	13,700	13,800	13,700
等电点	9.3	6.9	10.0	4.0

志谢：本工作中承蒙本所陈志民先生协助氨基酸组成的测定，致以谢意。

参 考 文 献

〔1〕 云南动物研究所四室：蛇毒的研究与利用。1.我国几种常见毒蛇的酶活力测定 生物化学与生物物理学报，1976，8，151。

〔2〕 吴兴陆，陈远聪 我国十种蛇毒磷脂酶A的活力比较（本集23页）。

〔3〕 Tu, A.T. Venoms; Chemistry and molecular Biology, 1977,28.

〔4〕 Lee, C.Y. Snake Venoms, Handb. Exp. Pharmacol; Vol.52 1979, 121.

〔5〕 陈远聪等，蝮蛇突触前神经毒素的分离纯化及其生化性质的进一步研究 生物化学与生物物理学报 1981，13，205。

〔6〕 莽克强等，聚丙烯酰胺凝胶电泳，1975。

〔7〕 Baily, J.L. Techinques in Protein Chemistry, 1962,99.

〔8〕 Kawauchi, S. et al. Isolation and characterization of two phospholipase A's from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. Biochem. Biophys. Acta. 1971, 236,142.

〔9〕 Wells, M.A. and Hanahan, D.J. Studies on phospholipase A. 1. Isolation and characterization of two enzymes from *Crotalus adamentus* venom. Biochemistry, 1969, 8,414.

〔10〕 Marinetti, G.V. The action of phopholipase A on lipoproteins. Biochem. Biophys. Acta 1965, 98,554.

〔11〕 Salach J. et al. Phopholipase A of snakes. 1, Isolation and molecular properties of isoenzymes from *Naja naja and Vipera russelli* venoms. 1971, J.Biol. Chem. 1971, 246,331.

〔12〕 冉永禄：福建产圆斑蝰蛇蛇毒磷脂酶A的分离纯化及其部分性质研究（本集3页）。

〔13〕 罗林娣等：聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦的一种快速染色法。上海市生化学会1979年年会论文摘要。

〔14〕 Matsubara H. et al, High recovery of tryptophan from acid hydrolysate of proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1969,35,175.

ISOLATION, PURIFICATION AND PROPERTIES OF THE BASIC PHOSPHOLIPASE A FROM THE SNAKE VENOM OF *AGKISTRODON HALYS* PALLAS IN ZHEJIANG

Wu Xiang-fu Chen Yuan-chung
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

ABSTRACT

Two peaks with phospholipase A activity were found by DEAE-cellulose chromatography from the snake venom of *Agkistrodon halys* Pallas in Zhejiang. One of them was first eluted by the equilibrium buffer, which was the basic phospholipase A. Another one eluted by the buffer containing 0.1*M* NaCl is composed of an acidic phospholipase A and the presynaptic neurotoxin, which had been reported in the preceding paper.

In this paper, we report the purification and properties of the basic phospholipase A. The enzyme was further purified by P-cellulose, CM-Sephadex C-50 and Sephadex G-75 chromatographies. This purified protein appeared to be a single band on polyacrylamide gel electrophoresis. Its molecular weight is about 13,800, composed of 121 amino acid residues, rich in 1/2cystine (14), Tyrosine, glycine and proline, its isoelectric point is 9.3.

Like the other phospholipase A found in snake venoms, the basic phospholipase A exhibits extreme heat-stability. It remains part of its activity by treating with trypsin.